

การคัดกรองแอคติโนแบคทีเรียที่ผลิตสารต้านจุลชีพจากดินป่าพรุเพื่อต้าน *Candida albicans*

Screening of antimicrobial-producing actinobacteria from peat soils against *Candida albicans*

เจษฎา ทองทัศนีย์¹, ชลธิชา เบ็ญพาด¹, จินตนาถ วงศ์ชวลิต¹ และรัชณี มิ่งมา^{1*}

Jetsda Tongtoht¹, Chonticha Benpard¹, Jintanart Wongchawalit¹ and Ratchanee Mingma^{1*}

Received: 2 January 2025 ; Revised: 8 July 2025 ; Accepted: 5 August 2025

บทคัดย่อ

ยีสต์ *Candida albicans* เป็นเชื้อก่อโรคที่พบบ่อยที่สุด ซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในเยื่อเมือกและระบบต่าง ๆ ของร่างกาย นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อราจากทั่วโลกประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ สารประกอบที่ได้จากจุลินทรีย์กำลังได้รับความสนใจในฐานะทางเลือกที่มีแนวโน้มดีในการควบคุมโรคจากเชื้อรา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการต่อสู้กับเชื้อ *C. albicans* ซึ่งอาจต้องอยู่ในระหว่างการรักษา งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินฤทธิ์การต้าน *C. albicans* CBS 562 ของแอคติโนแบคทีเรียที่แยกจากดินป่าพรุ แอคติโนแบคทีเรียทั้งหมด 20 ไอโซเลต ที่นำมาทดสอบแสดงฤทธิ์ต้าน *C. albicans* CBS 562 บนอาหารแข็ง starch casein และ glucose yeast extract malt extract โดยใช้วิธี agar overlay ไอโซเลต 11A3 และ 41N6 ซึ่งแสดงฤทธิ์การยับยั้งมากที่สุดถูกคัดเลือกเพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้าน *C. albicans* CBS 562 ของสารสกัดหยาบ พบว่าสารสกัดหยาบจาก 11A3 และ 41N6 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* CBS 562 โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ยับยั้งการเจริญ (MIC) เท่ากันที่ 3.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อรา (MFC) เท่ากับ 6.250 และ 3.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าไอโซเลต 11A3 และ 41N6 อยู่ในสกุล *Streptomyces* และมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงที่สุดกับ *Streptomyces murinus* NBRC 12799^T (99.54 เปอร์เซ็นต์) และ *Streptomyces malaysiense* MUSC 136^T (99.37 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าแอคติโนแบคทีเรียมีศักยภาพสูงในการยับยั้ง *C. albicans* ซึ่งอาจนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในด้านเทคโนโลยีชีวภาพและเภสัชกรรม

คำสำคัญ: แอคติโนแบคทีเรีย, *Candida albicans*, ฤทธิ์ต้านแคนดิดา, *Streptomyces*

Abstract

Yeast *Candida albicans* is the most frequent pathogen responsible for mucosal and systemic infections. Furthermore, it is the primary cause of approximately 70% of fungal infections globally. Microorganism-derived compounds are gaining attention as a promising alternative approach for controlling fungal diseases. The use of these compounds to combat *C. albicans*, which may develop drug resistance during therapy, is particularly promising. This study aimed to assess the anticandidal activity of actinobacteria obtained from peat soils against *C. albicans* CBS 562. Seventeen tested actinobacterial isolates exhibited anticandidal activity on starch casein agar and glucose yeast extract malt extract agar using the agar overlay method. The isolates 11A3 and 41N6, which showed the highest activity, were selected for evaluating the anticandidal efficacy of their crude extracts. The crude extracts of 11A3 and 41N6 demonstrated inhibitory effects on *C. albicans* CBS 562, with identical minimum inhibitory concentration (MIC) values of 3.125 mg/mL and minimum fungicidal concentration (MFC) values of 6.250 mg/mL and 3.125 mg/mL, respectively.

¹ ภาควิชาวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมชีวภาพ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

¹ Department of Science and Bioinnovation, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus.

* Corresponding author: Ratchanee Mingma, Email: ratchanee.mi@ku.th

Based on 16S rRNA gene sequence analysis, isolates 11A3 and 41N6 belong to the genus *Streptomyces*, showing the highest sequence similarity to *Streptomyces marinus* NBRC 12799^T (99.54%) and *Streptomyces malaysiense* MUSC 136^T (99.37%), respectively. This research indicates that actinobacteria have a strong potential to inhibit *C. albicans*, suggesting applications in biotechnology and pharmaceuticals.

Keywords: Actinobacteria, *Candida albicans*, anticandidal activity, *Streptomyces*

บทนำ

แคนดิดา อัลบิแคนส์ (*Candida albicans*) เป็นยีสต์ที่จัดเป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) อาศัยอยู่ตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น ช่องปาก ช่องคลอด ผิวหนัง ทางเดินปัสสาวะ และทางเดินอาหาร เป็นต้น เมื่อร่างกายมีภูมิคุ้มกันต่ำ เชื้อชนิดนี้จะเจริญและทำให้เกิดโรค เกิดการติดเชื้อที่ผิวหนังและเยื่อเมือกต่าง ๆ ยีสต์แคนดิดาเป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อจากราประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ทั่วโลก (Morad *et al.*, 2018) โรคจาก *C. albicans* เป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อที่คุกคามชีวิตในช่วงหลายทศวรรษที่ผ่านมา แม้จะได้รับการรักษาแล้ว แต่อัตราการเสียชีวิตยังสูงถึง 40 เปอร์เซ็นต์ (Basmaciyan *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2020) ปัจจุบันการรักษาโรคติดเชื้อจาก *C. albicans* นิยมใช้ยาปฏิชีวนะซึ่งมีข้อจำกัดและมีรายงานพบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ *C. albicans* เพิ่มขึ้น เช่น ยาฟลูโคนาโซล (fluconazole) (Berkow & Lockhart, 2017) ดังนั้นการพัฒนาและค้นหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งยีสต์ก่อโรค *C. albicans* จึงมีความสำคัญ

แอคติโนแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีปริมาณของเบสกวานีนและไซโทซีนในจีโนมสูงมากกว่า 55 เปอร์เซ็นต์ (Duddu & Guntuku, 2015; Jose & Jha, 2016) เป็นแบคทีเรียกลุ่มสำคัญที่มีรายงานว่าสามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลายชนิด แอคติโนแบคทีเรียมีการเจริญเป็นเส้นสายที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับเชื้อรา แต่มีขนาดของเส้นใยเล็กกว่า แอคติโนแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่พบกระจายตัวทั่วไปในธรรมชาติ สามารถพบได้ทุกสภาพแวดล้อมทั้งในดินและแหล่งน้ำ (Shrestha *et al.*, 2021) มีรายงานว่าแอคติโนแบคทีเรียผลิตสารเมแทบอไลต์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลายชนิดคิดเป็น 45 เปอร์เซ็นต์ของสารเมแทบอไลต์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งหมดที่ผลิตจากจุลินทรีย์ เช่น สารปฏิชีวนะต้านเชื้อรา สารต้านมะเร็ง สารกดระบบภูมิคุ้มกัน สารฆ่าแมลง และสารปราบวัชพืช เป็นต้น (Abdel-Razek *et al.*, 2020; Bubic, 2018; Harir *et al.*, 2018) โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพประมาณ 7,600 ชนิดผลิตจากแอคติโนแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* spp. (Berdy, 2005)

ป่าพรุ (peat swamp forest) เป็นป่าดิบชื้นชนิดหนึ่งที่แตกต่างกันจากป่าชนิดอื่น โดยมีน้ำท่วมขังตลอดทั้งปีและมี

กิจกรรมการย่อยสลายของจุลินทรีย์ต่ำ ดินของป่าพรุประกอบด้วยชั้นพีทหนาประมาณ 0.5-5 เมตร มีค่า pH เป็นกรดอยู่ในช่วง 4.0-6.0 (Niyasom *et al.*, 2015) ตามรายงานการแยกและศึกษาแอคติโนแบคทีเรียจากดินพรุในประเทศไทย พบว่ามีการค้นพบแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่หลายชนิด เช่น *Streptomyces acididurans* และ *Streptomyces acidicola* (Chantavorakit *et al.*, 2021; Lipun *et al.*, 2020) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Thawai *et al.* (2000) และ Niyasom *et al.* (2015) ที่พบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์หลายชนิดของแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้จากดินพรุในจังหวัดตรังและพัทลุงของประเทศไทย ซึ่งแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคหลายชนิด จากเหตุผลดังกล่าวป่าพรุจึงจัดเป็นระบบนิเวศที่จำเพาะและน่าสนใจในการศึกษากิจกรรมการยับยั้งยีสต์ก่อโรค *C. albicans* ของแอคติโนแบคทีเรีย วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้คือเพื่อศึกษากิจกรรมของแอคติโนแบคทีเรียที่แยกจากดินป่าพรุต่อการยับยั้งยีสต์ *C. albicans* ซึ่งอาจนำไปสู่ความรู้ใหม่ที่มีประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพ และเภสัชกรรมต่อไปในอนาคต

การทดลอง

1. การเตรียมเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย

นำแอคติโนแบคทีเรียจำนวน 20 ไอโซเลตที่แยกจากดินป่าพรุ ของสวนพฤกษศาสตร์ อำเภอกาหลง จังหวัดระยอง ประเทศไทย มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง International *Streptomyces* Project 2 (ISP2) agar (Shirling & Gottlieb, 1966) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้หลอดเชื้อเชื้อ (loop) ที่ผ่านการเผาไฟจนร้อนแดง เชียสเปอร์และเส้นใย 1-2 หลูป ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ที่มี 0.85 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร เพื่อเตรียมเป็นซัสเพนชัน (suspension) สำหรับการทดลองในขั้นตอนถัดไป

2. การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งยีสต์ *C. albicans* CBS 562

ทดสอบกิจกรรมการยับยั้งยีสต์ *C. albicans* CBS 562 ด้วยวิธี agar overlay (Mingma *et al.*, 2014) บนอาหาร

แข็ง starch casein (SC) และ glucose yeast extract malt extract (GYM) (Ait Assou *et al.*, 2023) ดูดซัสเพนชันแอกติโนแบคทีเรียปริมาตร 5 ไมโครลิตร หยดบนผิวหน้าอาหารทดสอบ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน เตรียมยีสต์ทดสอบโดยเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลว Yeast extract peptone dextrose (YPD) บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับให้มีปริมาณเซลล์เริ่มต้น (10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 0.12 จากนั้นดูดเซลล์ยีสต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมในอาหารแข็งกึ่งเหลว YPD soft agar (วุ้น 0.5 เปอร์เซ็นต์, w/v) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเทราดบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียไว้ 7 วัน บ่มเพิ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีแอกติโนแบคทีเรีย วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งและเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีแอกติโนแบคทีเรียในหน่วยเซนติเมตร คำนวณค่าความสามารถในการยับยั้ง (Inhibition capacity; IC) ซึ่งเป็นอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี

3. การสกัดสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิจากแอกติโนแบคทีเรีย

คัดเลือกแอกติโนแบคทีเรียที่ให้ผลการยับยั้งยีสต์บนจานอาหารแข็งดีที่สุด นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว Tryptic soy (TS) ที่เติมน้ำตาลกลูโคส 1.0 เปอร์เซ็นต์ บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,900 g เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสด้านบนนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทในอัตราส่วน 1:1 (v/v) เขย่าข้ามคืนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที จากนั้นเก็บชั้นของตัวทำละลายนำมาระเหยแยกตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน (evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ละลายสารสกัดที่ได้ออกด้วยสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ (V/V) ไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide, DMSO) ให้ได้ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สำหรับการทดสอบในขั้นตอนถัดไป

4. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดยับยั้ง *C. albicans* CBS 562

ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดยับยั้งต่อการยับยั้ง *C. albicans* CBS 562 ด้วยวิธี agar well diffusion โดย

เตรียมเชื้อ *C. albicans* ให้มีปริมาณเซลล์เริ่มต้น 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามวิธีการข้อ 2 จากนั้นเกลี่ยเชื้อ *C. albicans* ให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็งทดสอบ Sabouraud dextrose (SD) (HiMedia, India) โดยใช้ไม้พันสำลี (cotton swab) ป้อนเชื้อรอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้ที่เจาะจุกคอร์ก (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เจาะหลุมบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อและเติมสารสกัดยับยั้งปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ใช้ยาปฏิชีวนะในสแตติน (nystatin) เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) และสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ (V/V) DMSO เป็นตัวควบคุมผลลบ (negative control) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งที่เกิดขึ้นในหน่วยเซนติเมตร

5. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์

หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (minimum inhibitory concentration; MIC) ของสารสกัดยับยั้งต่อการยับยั้ง *C. albicans* CBS 562 ในเพลท 96 หลุม (96-well plate) ตามวิธีดัดแปลงของ Jamal and Satheesh (2022) ดังนี้ เติมน้ำอาหารเหลว SD ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม แล้วเติมสารสกัดยับยั้งปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในหลุมแรก ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่หลุมที่ 2 เพื่อเจือจางสารสกัดยับยั้งที่ละ 2 เท่า ทำซ้ำจนถึงหลุมที่ 10 และดูดสารละลายในหลุมสุดท้ายทิ้งไป 50 ไมโครลิตร จะได้ความเข้มข้นของสารสกัดยับยั้งในช่วง 12.5 – 0.024 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ จากนั้นเติมเชื้อ *C. albicans* CBS 562 (10^7 เซลล์/มิลลิลิตร) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชุดควบคุมผลลบ คือหลุมที่มีอาหารเหลว SD เพียงอย่างเดียว และชุดควบคุมผลบวก คือหลุมที่มียีสต์ในอาหารเหลว SD ที่ไม่มีการเติมสารสกัดยับยั้ง เมื่อครบเวลาเติมสารละลาย 0.02 เปอร์เซ็นต์ รีซาซูลิน (resazurin) หลุมละ 30 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบโดยสังเกตการเปลี่ยนสีรีซาซูลิน ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดยับยั้งที่ทำให้รีซาซูลินไม่เปลี่ยนเป็นสีชมพูบันทึกเป็นค่า MIC

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อรา (minimum fungicidal concentration; MFC) ใช้หลอดเชื้อเชื้อจุลินทรีย์ในแต่ละหลุม นำมาลาบนอาหารแข็ง SD บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของยีสต์ ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดยับยั้งที่ไม่พบการเจริญของยีสต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกเป็นค่า MFC

6. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอดดีโนแบคทีเรีย

เลี้ยงแอดดีโนแบคทีเรียบนจานอาหารแข็ง ISP 3 (Shirling & Gottlieb, 1966) จากนั้นปิ้งกระจกปิดสไลด์ปลอดเชื้อให้เย็นทำมุม 45 องศากับผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ดึงกระจกปิดสไลด์นำมาวางบนแผ่นสไลด์ที่หยดสีย้อมคริสตัลไวโอเล็ต นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายภาพ 1000 เท่า เพื่อศึกษาโครงสร้างเส้นใยและการจัดเรียงตัวของสปอร์ บันทึกสีสปอร์สีเส้นใยอาหาร และสีรงควัตถุของแอดดีโนแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร ISP 3

7. การระบุชนิดของแอดดีโนแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rRNA

เลี้ยงแอดดีโนแบคทีเรียในอาหารเหลว Glucose yeast extract (GYE) บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เก็บตะกอนเซลล์หลังการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำมาสกัดเอนโดตามวิธีดัดแปลงของ Také *et al.* (2015) นำดีเอ็นเอมาทำพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA โดยใช้ไพรเมอร์ 1F (5'-TCACGGAGAGTGTGATCCTG-3') และ 1530R (5'-AAGGAGATCCAGCCGCA-3') (Kataoka *et al.*, 1997) โดยใช้สภาวะในการทำพีซีอาร์ตามที่ระบุโดย Mingma *et al.* (2014) กำจัดไพรเมอร์ออกจากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยชุดสกัดเจลและและพีซีอาร์สำเร็จรูป FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit (Favrogen, Taiwan) ตามคู่มือแนะนำ และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล EzBioCloud (Yoon *et al.*, 2017) เพื่อระบุชนิดของแอดดีโนแบคทีเรีย สร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ด้วยวิธี Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) เพื่อดูความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรม MEGA 11.0 (Tamura *et al.*, 2021)

8. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลถูกนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) โดยใช้ซอฟต์แวร์ R เวอร์ชัน 4.4.0 โดยข้อมูลในแต่ละการทดลองจะแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ ($n = 3$) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$

ผลการทดลองและอภิปรายผล

1. ทดสอบการยับยั้งยีสต์แคนดิดาขึ้นปฐมภูมิ

จากการศึกษากิจกรรมการยับยั้งยีสต์ *C. albicans* CBS 562 ด้วยวิธี agar overlay พบว่าแอดดีโนแบคทีเรียจำนวน 17 ไอโซเลต จากทั้งหมด 20 ไอโซเลต (คิดเป็น 85 เปอร์เซ็นต์) สามารถยับยั้งยีสต์แคนดิดาได้ (Figure 1) มีแอดดีโนแบคทีเรียจำนวน 8 ไอโซเลต ให้ผลการยับยั้งยีสต์เมื่อเลี้ยงบนอาหาร SC โดยมีค่าความสามารถการยับยั้ง 1.27 ± 0.32 ถึง 4.10 ± 0.90 และมีแอดดีโนแบคทีเรียจำนวน 14 ไอโซเลต ให้ผลการยับยั้งยีสต์เมื่อเลี้ยงบนอาหาร GYM มีค่าความสามารถในการยับยั้ง 0.46 ± 0.06 ถึง 5.57 ± 0.15 (Table 1) ไอโซเลต 21N3 ให้ผลการยับยั้งยีสต์สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงบนอาหาร SC แต่สูญเสียกิจกรรมการยับยั้งเมื่อเลี้ยงบนอาหาร GYM เช่นเดียวกับไอโซเลต 11A3 และ 41N6 ให้ผลการยับยั้งยีสต์บนอาหาร GYM สูงที่สุด แต่ไม่มีกิจกรรมการยับยั้งเมื่อเลี้ยงบนอาหาร SC มีแอดดีโนแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลต ยับยั้งยีสต์ได้บนอาหารทั้ง 2 ชนิดแต่ให้ผลการยับยั้งในระดับปานกลาง เช่น ไอโซเลต 21N2 และ 21N18 งานวิจัยของ Assou *et al.* (2023) ทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค พบว่าแอดดีโนแบคทีเรียไอโซเลต BS61 ยับยั้ง *Listeria innocua* ได้ดีเมื่อเลี้ยงบนอาหาร SC แต่สูญเสียกิจกรรมการยับยั้งเมื่อเลี้ยงบนอาหาร GYM และ Bennett's ไอโซเลต DS169 ยับยั้ง *C. albicans* เมื่อเลี้ยงบนอาหาร Bennett's และ SC และยับยั้ง *S. aureus* เฉพาะเมื่อเลี้ยงบนอาหาร Bennett's สอดคล้องกับงานวิจัยนี้ โดยไอโซเลต 21N3, 51N2 และ 21A2 พบการต้านยีสต์เมื่อเลี้ยงบนอาหาร SC แต่ไม่พบการต้านยีสต์บนอาหาร GYM และในขณะเดียวกัน พบมี 9 ไอโซเลต เช่น 41N6 ที่แสดงการต้านยีสต์บนอาหาร GYM เท่านั้น งานวิจัยของ Arasu *et al.* (2009) เลี้ยงแอดดีโนแบคทีเรียในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื่อว่าการผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดีกว่าอาหารที่มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน ทั้งนี้ นอกเหนือจากองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นปัจจัยสำคัญต่อการผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของแอดดีโนแบคทีเรียแล้ว ยังขึ้นกับปัจจัยภายนอกอื่น ๆ ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง และอัตราการกวนเป็นต้น (AL-Ghazali & Omran, 2017; Evangelista-Martínez *et al.*, 2023)

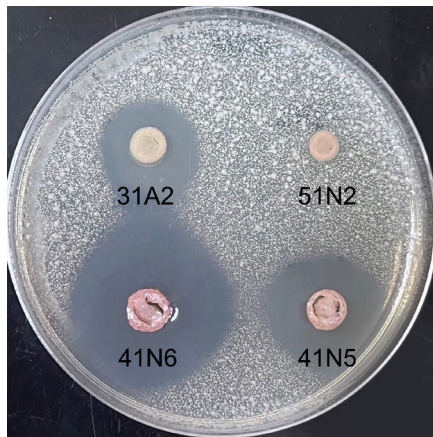


Figure 1 Selected representative examples of actinobacteria isolates showing anticandidal activities.

Table 1 Anticandidal activity of actinobacteria on SC and GYM agar medium for 7 days at 28 °C.

Isolate	Inhibition capacity (IC)	
	SC	GYM
21N2	1.68 ± 0.11^{cd}	0.46 ± 0.06^d
21N3	4.10 ± 0.90^a	-
21N12	-	2.39 ± 0.55^{bcd}
21N18	1.84 ± 0.15^{bcd}	4.11 ± 3.08^{ab}
31N1	2.50 ± 0.30^b	1.71 ± 0.34^{cd}
31N2	-	1.81 ± 0.92^{cd}
41N5	-	2.33 ± 0.45^{bcd}
41N6	-	5.53 ± 0.12^a
51N2	1.67 ± 0.02^{cd}	-
11A3	-	5.57 ± 0.15^a
21A2	1.90 ± 0.19^{bcd}	-
31A2	2.05 ± 0.28^{bc}	3.97 ± 1.10^{ab}
51A2	-	1.63 ± 0.08^{cd}
42N4	-	1.30 ± 0.20^{cd}
52A4	1.27 ± 0.32^d	1.49 ± 0.17^{cd}
52A10	-	2.65 ± 1.19^{bc}
43A1	-	1.74 ± 0.66^{cd}

Note: -, no activity. The level of inhibition was calculated from the ratio between the diameter of the inhibition zone and actinobacterial colony (3 replicates). Different superscript letters within the same column indicate statistically significant differences at $p < 0.05$ according to Duncan's Multiple Range test.

2. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบในการยับยั้งยีสต์ *C. albicans* CBS 562

คัดเลือกแอคติโนแบคทีเรียที่ให้ผลการยับยั้งยีสต์ดีที่สุดจำนวน 2 ไอโซเลต คือ 11A3 และ 41N6 นำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบต่อการยับยั้งยีสต์ *C. albicans* CBS 562 ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าสารสกัดหยาบจาก 11A3 และ 41N6 สามารถยับยั้งยีสต์ *C. albicans* โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งเท่ากับ 1.90 ± 0.20 และ 1.77 ± 0.12 เซนติเมตร (Table 2) ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตทสามารถยับยั้งยีสต์ได้ดี โดยมีฤทธิ์ต้าน *C. albicans* มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะไนสแตติน

งานวิจัยของ Sarika *et al.* (2021) ทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง *C. albicans* ของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทจากแอคติโนแบคทีเรียที่แยกจากดินในประเทศอินเดีย ด้วยวิธี agar well diffusion พบมีจำนวน 21 จาก 28 ไอโซเลตแสดงกิจกรรมการยับยั้งได้ คิดเป็น 75 เปอร์เซ็นต์โดยไอโซเลต BHPL-KSKU5 มีกิจกรรมยับยั้งสูงสุดโดยมีโซนยับยั้งเท่ากับ 1.60 ± 0.40 เซนติเมตร

งานวิจัยของ Wei *et al.* (2020) พบว่าสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเมทานอลจาก *Streptomyces* sp. YYS-7 ที่แยกจากดินรอบรากพืชในประเทศจีน มีกิจกรรมในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในพืชได้หลายชนิดอย่างมีประสิทธิภาพ เช่น *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum fragariae*, *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Colletotrichum acutatum* จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าแอคติโนแบคทีเรียที่แยกจากดินสามารถยับยั้งเชื้อยีสต์แคนดิดารวมถึงราเส้นใยอื่น ๆ ได้

Table 2 Anticandidal activity of crude ethyl acetate extracts of 11A3 and 41N6

Crude extract	Zone of inhibition (cm)
11A3	1.90 ± 0.20^b
41N6	1.77 ± 0.12^b
Nystatin (50 mg mL ⁻¹)	3.48 ± 0.03^a
Dimethyl sulfoxide	-

Note: -, no activity

The level of growth inhibition was assessed by the average zone of inhibition diameter recorded (3 replicates). Different superscript letters within the same column indicate statistically significant differences at $p < 0.05$ according to Duncan's Multiple Range test.

3. การหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ยับยั้งและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์

หาค่า MIC ของสารสกัดหยาบด้วยวิธี broth microdilution โดยใช้ตัวบ่งชี้คือการเปลี่ยนสีของรีซารูริน (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide) ในเพลท 96 หลุม รีซารูรินนิยมใช้เป็นตัวบ่งชี้ความมีชีวิตของเซลล์ โดยรีซารูรินมีสีน้ำเงินเมื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ในไมโทคอนเดรีย เช่น เอนไซม์ NADPH dehydrogenase ซึ่งพบในเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิต จะถูกเปลี่ยนเป็นสารรีโซรูฟีน (resorufin) ซึ่งมีสีชมพู (O'Brien *et al.*, 2000) ดังนั้นเมื่อผสมรีซารูรินกับเซลล์แขวนลอย หากสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูบ่งชี้ว่าการเจริญของยีสต์เนื่องจากมีกิจกรรมของเอนไซม์ในไมโทคอนเดรีย แต่หากสารละลายไม่เปลี่ยนสี แสดงว่าไม่มีการเจริญของยีสต์

ผลการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบ 11A3 และ 41N6 มีค่า MIC เท่ากันที่ 3.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Figure 2) สังเกตจากการเปลี่ยนแปลงของรีซารูรินในคอลัมน์ที่ 3 (3.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เทียบกับคอลัมน์ที่ 11 (negative control) คืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มียีสต์ทดสอบ โดยค่า MIC นั้นมีการผันแปรอันเนื่องมาจากหลายปัจจัย เช่น ชนิดของจุลินทรีย์ ความไวต่อสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของจุลินทรีย์ ความเข้มข้นและชนิดของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เวลา และอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง จุลินทรีย์ล้วนแล้วแต่เป็นปัจจัยที่มีผลต่อค่า MIC ทั้งสิ้น (Vangadeesh *et al.*, 2011) จากการหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดหยาบที่ฆ่าเชื้อราหรือค่า MFC พบว่าสารสกัดหยาบ 11A3 และ 41N6 มีค่า MFC เท่ากับ 6.250 และ 3.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Figure 3)

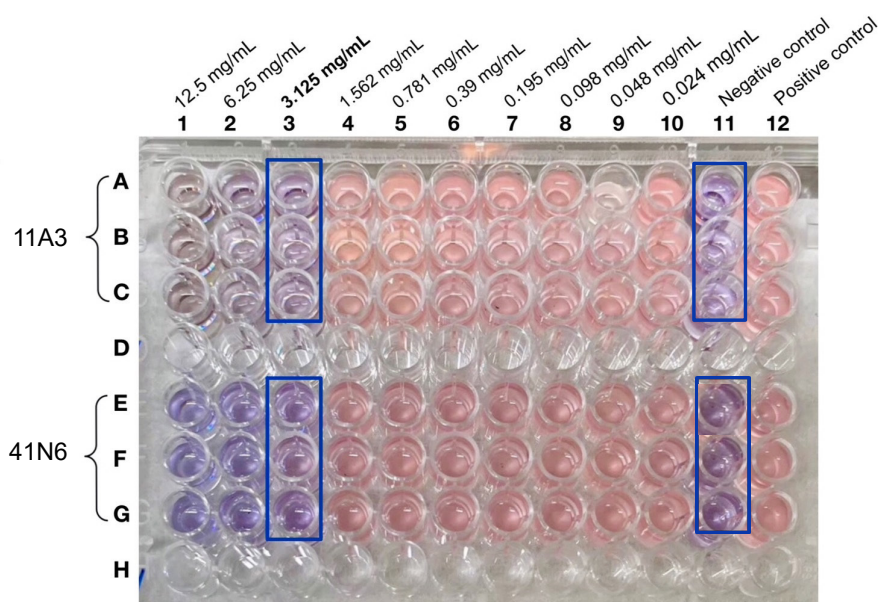


Figure 2 The 96 well plate broth microdilution method using Resazurin dye for the determination of the MIC of the actinobacterial extracts 11A3 and 41N6 against *Candida albicans* CBS 562.

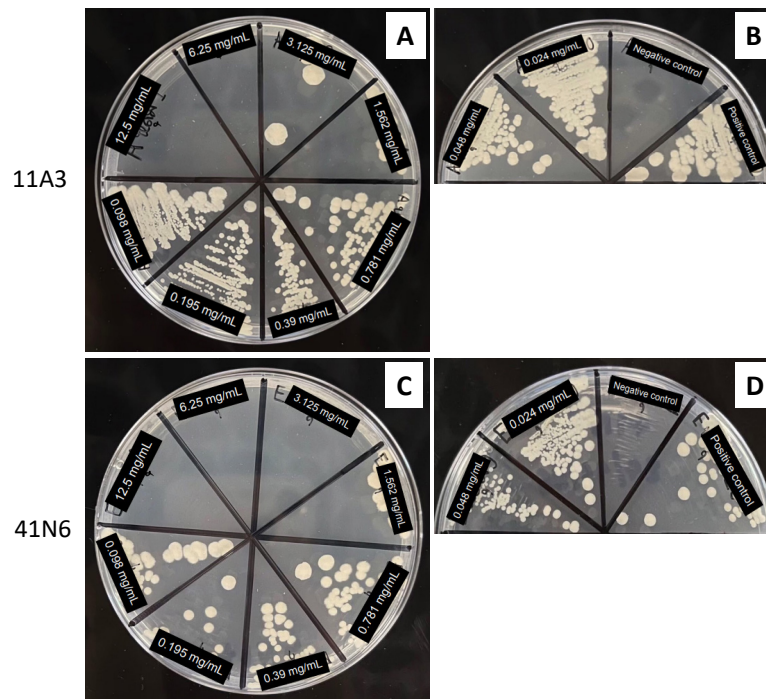


Figure 3 Plates for determining the minimum fungicidal concentration (MFC) of crude extracts from isolates 11A3 (A-B) and 41N6 (C-D) against *Candida albicans* CBS 562.

4. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนแบคทีเรีย

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต 11A3 และ 41N6 บนอาหาร ISP 3 โดยวิธีการลากเชื้อแบบตัดกัน (cross streak) พบว่าทั้ง 2 ไอโซเลตมีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน โดยไอโซเลต 11A3 สร้างสปอร์สีน้ำตาลกระจาย

เป็นวงรอบโคโลนี เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายภาพ 1000 เท่า พบเส้นใยและสายสปอร์ขนาดเล็กที่มีลักษณะขดเป็นเกลียว ส่วนไอโซเลต 41N6 สร้างสปอร์สีน้ำตาลอ่อน พบเส้นใยและสายสปอร์ที่มีลักษณะขดเป็นเกลียว (Figure 4) บ่งชี้ให้เห็นว่าทั้ง 2 ไอโซเลตจัดอยู่ในสกุล *Streptomyces*

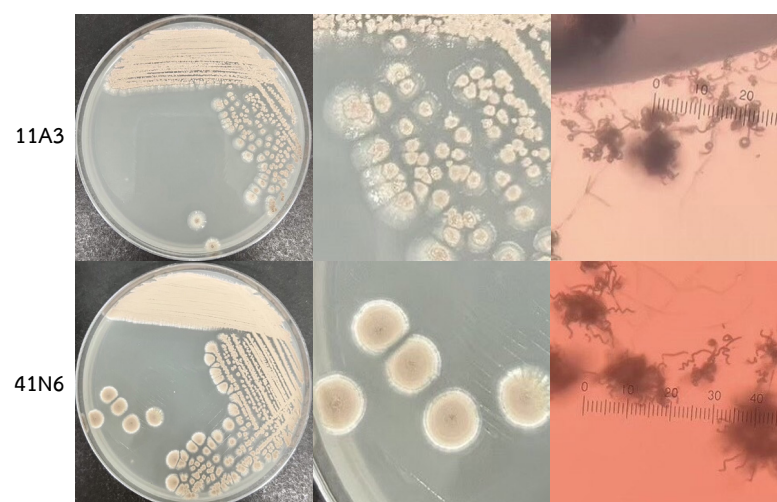


Figure 4 Morphological characterization and microscopic observation of actinobacteria isolates 11A3 and 41N6 grown on ISP 3 medium after incubation at 28 °C for 7 days.

5. การจัดจำแนกแอกติโนแบคทีเรียด้วยเทคนิคทางโมเลกุลโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rRNA

จากการระบุชนิดของแอกติโนแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rRNA พบว่าไอโซเลต 11A3 และ 41N6 จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* (Figure 5) โดยมีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces murinus* NBRC 12799^T (AB184155) 99.54 เปอร์เซ็นต์ และ *Streptomyces malaysiense* MUSC 136^T (LBDA02000093) 99.37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 3) สอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่พบว่าแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* ที่แยกจากดินมีการแสดงกิจกรรมทางชีวภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่น

มากกว่าแอกติโนแบคทีเรียในสกุลอื่น (Charousova *et al.*, 2017; Daquioag & Penuliar, 2021; Jeffrey *et al.*, 2011; Sengupta *et al.*, 2015; Teo *et al.*, 2021; Tongtoht *et al.*, 2024) งานวิจัยของ Teo *et al.* (2021) ศึกษากิจกรรมการยับยั้งเชื้อราของแอกติโนแบคทีเรียที่แยกจากดินป่าพรุคันธุลี จังหวัดสุราษฎร์ธานี พบว่าแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* มีกิจกรรมทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อราได้หลายชนิดอย่างมีประสิทธิภาพ โดยสกุล *Streptomyces* มีรายงานผลิตสารประกอบออกฤทธิ์ทางชีวภาพประมาณ 100,000 ชนิด ซึ่งคิดเป็น 70–80 เปอร์เซ็นต์ ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพตามธรรมชาติทั้งหมดที่มีการใช้งานทางเภสัชกรรมและการเกษตร (Abdel-Razek *et al.*, 2020; Bubici, 2018; Harir *et al.*, 2018)

Table 3 Identification of actinobacteria based on 16S rRNA gene sequences.

Isolate	Accession number of 16S rRNA gene	Closely related taxa identified by using the EzBioCloud server database (http://eztaxon-e.ezbiocloud.net)	Sequence similarity (%) of 16S rRNA gene	Difference / total nucleotide
11A3	PQ144678	<i>Streptomyces murinus</i> NBRC 12799 ^T (AB184155)	99.54	5/1080
41N6	PQ144677	<i>Streptomyces malaysiense</i> MUSC 136 ^T (LBDA02000093)	99.37	7/1113

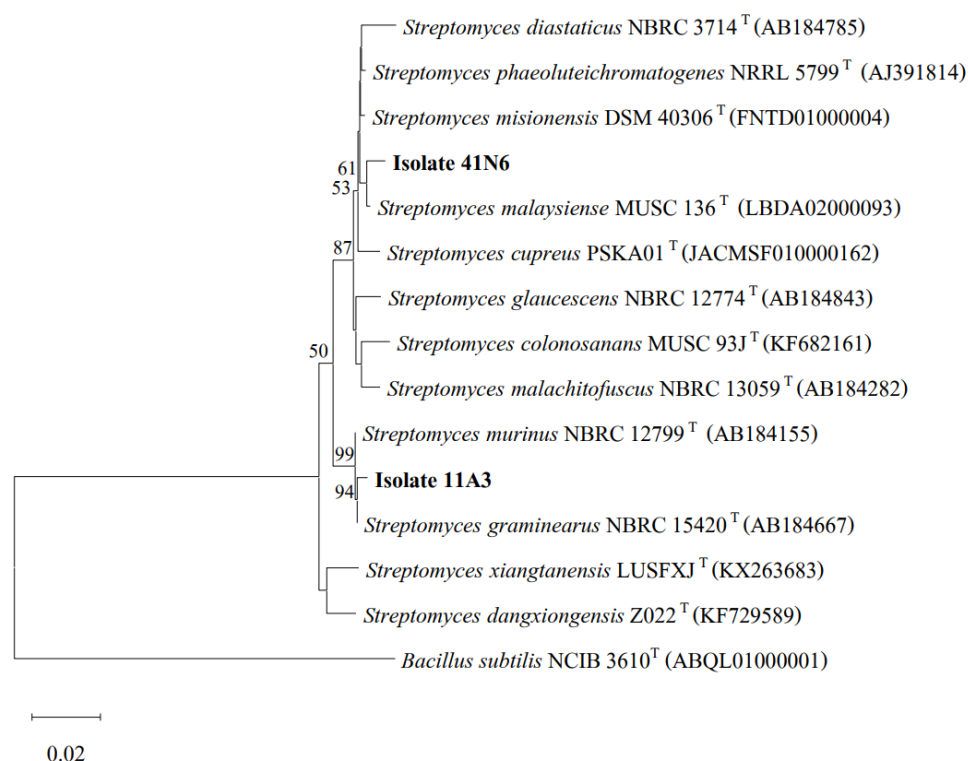


Figure 5 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences obtained by the neighbor-joining (NJ) method showing the phylogenetic relationships among two actinobacterial phylotypes of this study (shown in boldface) and related actinobacteria. Numbers at nodes indicate levels of bootstrap support (%) based on a NJ analysis of 1,000 resampled datasets; only values greater than 50 % are shown.

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษากิจกรรมการยับยั้งยีสต์ *C. albicans* CBS 562 ด้วยวิธี agar overlay บนอาหารแข็ง GYM และ SC ของแอคติโนแบคทีเรียทั้งหมด 20 ไอโซเลต ที่แยกจากดินป่าพรุ พบว่ามี 17 ไอโซเลต สามารถยับยั้งยีสต์ *C. albicans* CBS 562 โดยส่วนใหญ่แสดงกิจกรรมการยับยั้งยีสต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYM มากกว่า SC ทำการคัดเลือกแอคติโนแบคทีเรียที่ให้ผลการยับยั้งยีสต์ดีที่สุดจำนวน 2 ไอโซเลต คือ 11A3 และ 41N6 มาทำการสกัดสารสกัดหยาบด้วยเอทิลอะซิเตท พบว่า สารสกัดหยาบจากไอโซเลต 11A3 และ 41N6 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของยีสต์แคนดิดา โดยมีความกว้างโซนยับยั้งเท่ากับ 1.90 ± 0.20 และ 1.77 ± 0.12 เซนติเมตร ตามลำดับ

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่ยับยั้งยีสต์ (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่ายีสต์ (MFC) พบว่าสารสกัดหยาบจากไอโซเลต 11A3 และ 41N6 มีค่า MIC เท่ากันที่ 3.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า MFC เท่ากับ 6.250 และ 3.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rRNA พบว่าทั้ง 2 ไอโซเลต จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* sp. โดยไอโซเลต 11A3 มีความคล้ายคลึงมากที่สุดกับ *Streptomyces murinus* NBRC 12799^T (99.54 เปอร์เซ็นต์) และไอโซเลต 41N6 มีความคล้ายคลึงมากที่สุดกับ *Streptomyces malaysiense* MUSC 136^T (99.37 เปอร์เซ็นต์) งานวิจัยนี้บ่งชี้ให้เห็นว่าแอคติโนแบคทีเรียจากดินป่าพรุในประเทศไทยมีศักยภาพในการยับยั้งยีสต์ *C. albicans* ที่ดี

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบมีฤทธิ์ยับยั้งยีสต์แคนดิดา ดังนั้นสามารถนำมาศึกษาต่อเพื่อระบุชนิดและโครงสร้างของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมถึงทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) เพื่อเป็นแนวทางในการนำมาประยุกต์ใช้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพและเภสัชกรรมต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

Abdel-Razek, A. S., El-Naggar, M. E., Allam, A., Morsy, O. M., & Othman, S. I. (2020). Microbial natural products in drug discovery. *Processes*, 8(4), 470.

Ait Assou, S., Anissi, J., Sendide, K., & El Hassouni, M. (2023). Diversity and antimicrobial activities of actinobacteria isolated from mining soils in Midelt

region, Morocco. *Scientific World Journal*, 2023, 6106673.

- AL-Ghazali, L. H., & Omran, R. (2017). Optimization production conditions of antibacterial metabolite from *Streptomyces* sp. *Optimization*, 10(9), 386–391.
- Arasu, M. V., Duraipandiyan, V., Agastian, P., & Ignacimuthu, S. (2009). In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). *Journal de Mycologie Médicale*, 19(1), 22–28.
- Basmaciyan, L., Bon, F., Paradis, T., Lapaquette, P., & Dalle, F. (2019). *Candida albicans* interactions with the host: Crossing the intestinal epithelial barrier. *Tissue Barriers*, 7(2), 1612661.
- Berdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 58(1), 1–26.
- Berkow, E. L., & Lockhart, S. R. (2017). Fluconazole resistance in *Candida* species: A current perspective. *Infection and Drug Resistance*, 10, 237–245.
- Bubici, G. (2018). *Streptomyces* spp. as biocontrol agents against *Fusarium* species. *CABI Reviews*, 13, 1–15.
- Chantavorakit, T., Klaysubun, C., & Duangmal, K. (2021). *Streptomyces acididurans* sp. nov., isolated from peat swamp forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(7), 004849.
- Charousová, I., Medo, J., Halenářová, E., & Javoreková, S. (2017). Antimicrobial and enzymatic activity of actinomycetes isolated from soils of coastal islands. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 8(2), 46–51.
- Chen, H., Zhou, X., Ren, B., & Cheng, L. (2020). The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. *Virulence*, 11(1), 337–348.
- Daquioag, J. E. L., & Penuliar, G. M. (2021). Isolation of actinomycetes with cellulolytic and antimicrobial activities from soils collected from an urban green space in the Philippines. *International Journal of Microbiology*, 2021, 1–14.
- Duddu, M. K., & Guntuku, G. (2015). Isolation and partial characterization of actinomycetes from mangrove sediment sample. *Journal of Global Biosciences*, 4(7), 2921–2929.

- Evangelista-Martínez, Z., Ríos-Muñiz, D. E., Gómez-Cano, J., Montoya-Hidalgo, A. C., & Ochoa-Solórzano, R. E. (2023). Anti-bacterial activity of *Streptomyces* sp. Y15 against pathogenic bacteria and evaluation of culture media for antibiotic production. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 25(1), 1–12.
- Harir, M., Bendif, H., Bellahcene, M., Fortas, Z., & Pogni, R. (2018). *Streptomyces* secondary metabolites. *Basic Biology and Applications of Actinobacteria*, 6, 99–122.
- Jamal, M. T., & Satheesh, S. (2022). Antibiofilm activity of secondary metabolites of sponge-associated bacterium *Alcanivorax* sp. from the Red Sea. *Frontiers in Marine Science*, 9, 980418.
- Jeffrey, L., Norzaimawati, A., & Rosnah, H. (2011). Prescreening of bioactivities from actinomycetes isolated from forest peat soil of Sarawak. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science*, 39(2), 245–253.
- Jose, P. A., & Jha, B. (2016). New dimensions of research on actinomycetes: Quest for next generation antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1295.
- Kataoka, M., Ueda, K., Kudo, T., Seki, T., & Yoshida, T. (1997). Application of the variable region in 16S rDNA to create an index for rapid species identification in the genus *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Letters*, 151(2), 249–255.
- Küster, E., & Williams, S. (1964). Selection of media for isolation of streptomycetes. *Nature*, 202(4935), 928–929.
- Lipun, K., Chantavorakit, T., Mingma, R., & Duangmal, K. (2020). *Streptomyces acidicola* sp. nov., isolated from a peat swamp forest in Thailand. *The Journal of Antibiotics*, 73(7), 435–440.
- Mingma, R., Pathom-aree, W., Trakulnaleamsai, S., Thamchaipenet, A., & Duangmal, K. (2014). Isolation of rhizospheric and roots endophytic actinomycetes from Leguminosae plant and their activities to inhibit soybean pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *glycine*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 271–280.
- Morad, H. O., Wild, A.-M., Wiehr, S., Davies, G., Maurer, A., Pichler, B. J., & Thornton, C. R. (2018). Pre-clinical imaging of invasive candidiasis using immunoPET/MR. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1996.
- Niyasom, C., Boonmak, S., & Meesri, N. (2015). Antimicrobial activity of acidophilic actinomycetes isolated from acidic soil. *Current Applied Science and Technology*, 15(2), 62–69.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., & Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267(17), 5421–5426.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425.
- Sarika, K., Sampath, G., Govindarajan, R. K., Ameen, F., Alwakeel, S., Al Gwaiz, H. I., Komuraiah, T. R., & Ravi, G. (2021). Antimicrobial and antifungal activity of soil actinomycetes isolated from coal mine sites. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(6), 3553–3558.
- Sengupta, S., Pramanik, A., Ghosh, A., & Bhattacharyya, M. (2015). Antimicrobial activities of actinomycetes isolated from unexplored regions of Sundarbans mangrove ecosystem. *BMC Microbiology*, 15, 1–16.
- Shirling, E. T., & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16(3), 313–340.
- Shrestha, B., Nath, D. K., Maharjan, A., Poudel, A., Pradhan, R. N., & Aryal, S. (2021). Isolation and characterization of potential antibiotic-producing actinomycetes from water and soil sediments of different regions of Nepal. *International Journal of Microbiology*, 2021, 5586165.
- Také, A., Matsumoto, A., Omura, S., & Takahashi, Y. (2015). *Streptomyces lactacystinicus* sp. nov. and *Streptomyces cyslabdanicus* sp. nov., producing lactacystin and cyslabdan, respectively. *The Journal of Antibiotics*, 68(5), 322–327.

- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027.
- Teo, W. F. A., Muangham, S., Lipun, K., & Duangmal, K. (2021). Effect of rice seeds germination bioprimered with actinomycetes isolated from peat swamp forest. *Chiang Mai Journal of Science*, 48(4), 996–1008.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Pongpech, P., & Suwanborirux, K. (2000). Antibiotic-producing actinomycetes from peat swamp forest soils in Trang. *The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24, 40.
- Tongtoht, J., Wongchawalit, J., & Mingma, R. (2024). Antimicrobial activities against pathogenic bacteria of marine actinobacteria isolated from mangrove sediments at Klong Khon mangrove forest, Thailand. *Science Essence Journal*, 40(1), 74–87.
- Vangadeesh, S., Sundarmurthi, C., Karthic, K., & Selvaraju, K. (2011). Production and evaluation of antibiotics from soil isolated actinomycetes. *International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences*, 1(1), 138–152.
- Wei, Y., Zhao, Y., Zhou, D., Qi, D., Li, K., Tang, W., Chen, Y., Jing, T., Zang, X., Xie, J., & Wang, W. (2020). A newly isolated *Streptomyces* sp. YYS-7 with a broad-spectrum antifungal activity improves the banana plant resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1712.
- Yoon, S.-H., Ha, S.-M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5), 1613–1617.